

## 树突状细胞的培养及成熟的鉴定

李 望, 张升宁, 冉江华, 苏晓三, 李来邦, 陈奕明  
(昆明市第一人民医院肝胆胰一科, 云南昆明 650101)

**[摘要]** **目的** 探讨人体外周血树突状细胞在体外培养诱导其成熟的方法, 通过得到成熟的细胞培养技术, 对树突状细胞功能的研究奠定实验基础. **方法** 通过 Ficoll-Hypaque 梯度离心法得到单个核细胞, 再诱导使其分化、扩增、纯化形成稳定的树突状细胞, 通过树突状细胞自身形态、特异性表型, 抗原摄取能力, 鉴别培养的细胞, 从而得到具有典型特征的树突状细胞. **结果** 树突状细胞培养第 7 天, 加入 LPS 后, 倒置显微镜及扫描电镜下观察, 树突状细胞成熟中, 细胞胞质增大, 细胞膜表面能形成大量树突状突起, 表面标志物 CD80、CD86、CD11c、HLA-DR 的表达增高 ( $P < 0.05$ ), 共聚焦显微镜下, 成熟的树突状细胞对抗原的吞噬能力减弱. **结论** Ficoll-Hypaque 梯度离心法能够得到稳定的树突状细胞体外培养体系.

**[关键词]** Ficoll-Hypaque 梯度离心法; 树突状细胞; 表型; 抗原; 吞噬

**[中图分类号]** R392.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 03-0034-04

## The Cultivation and Identification of Mature Dendritic Cells

LI Wang, ZHANG Sheng-ning, RAN Jiang-hua, SU Xiao-san, LI Lai-bang, CHEN Yi-ming  
(Dept. of Hepato-biliary-pancreatic Surgery, The 1st People's Hospital of Kunming, Kunming Yunnan  
650101, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the methods of inducing and culturing dendritic cells from human peripheral blood in vitro, in the purpose of preparing the further experiment for exploring the function of dendritic cells (DCs). **Methods** The CD14+mononuclear cells (PBMC) were obtained by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation. The stable mature DCs were harvested by the process of induction, amplification and purification. The typical DCs were identified by analyzing the morphology, phenotype and function. **Results** The morphology of DCs was irregular, and plenty of radial dendrites from cell bodies were observed under the invert microscope and fluorescent microscopy. The expression levels of CD83, CD80, CD86 and HLA-DR were increasing as the maturing of DCs according to the flowcytometer testing results ( $P < 0.05$ ). The antigen engulf function of imDCs was enhanced, while it was weakened in mDCs. **Conclusion** The isolated and purified imDCs could be induced to DCs by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation.

**[Key words]** Ficoll-Hypaque gradient centrifugation; Dendritic cells; Phenotype; Antigen; Phagocytosis

树突状细胞是机体内发现的具有最强专职抗原提呈细胞, 因其在成熟过程中能伸出大量树突样突起而得名, 人体树突状细胞起源于造血干细胞, 外周血树突状细胞在数量上不足外周血单个核细胞的 1%, 它能摄取、加工处理抗原, 并能将处理后的抗原递呈给 T 淋巴细胞. 未成熟的树突状细胞具有较强的迁移能力及摄取、加工抗原能力, 成熟的

树突状细胞能有效激活初始型 T 淋巴细胞, 并能启动、调控并维持免疫应答<sup>[1]</sup>.

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

外周血细胞由健康、成人自愿捐献, 淋巴细胞分

**[基金项目]** 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2011FZ299)

**[作者简介]** 李望 (1986~), 男, 湖南株洲市人, 医学硕士, 住院医师, 主要从事肝胆外科临床及研究工作.

**[通讯作者]** 张升宁. E-mail: zsn813@163.com

离液 (hyclone U.S.A), RPMI-1640 培养液 (eBioscience, U.S.A), 重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (RhGM-CSF) (eBioscience, U.S.A), 重组人白介素4 (rhIL-4) (eBioscience, U.S.A), 脂多糖 (LPS) (sigma U.S.A), 胎牛血清 (hyclone U.S.A), PE-CD80 (eBioscience, U.S.A), FITC-CD86 (eBioscience, U.S.A), PE-CD11c (eBioscience, U.S.A), PE-5.5HLA-DR (eBioscience, U.S.A), OLYMPUS 倒置显微镜 (Olympus, Japan), 微型扫描电镜 (日立, TM1000), 流式细胞仪 (Beckman Coulter), 激光共聚焦显微镜 (Leica SP50).

## 1.2 实验方法

**1.2.1 树突状细胞培养** 抽取空腹、健康成人外周血细胞, 肝素抗凝, 将细胞生理盐水稀释, 加入淋巴细胞分离液离心分层, 取第二层单个核层细胞层, 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 2.5 h, 获取贴壁的单个核细胞层, 经含 rhGM-CSF (100 ng/mL), rhIL-4 (50 ng/mL) 的用 RPMI-1640 完全培养基孵育 1 d 后, 即得到未成熟的树突状细胞, 诱导树突状细胞第 6 天用脂多糖 (LPS) 刺激产生成熟的树突状细胞。

**1.2.2 树突状细胞形态学观察** 分别于树突状细胞培养第 1 天, 第 6 天, 第 7 天, 倒置显微镜下观察树突状细胞形态的改变。收集培养 7 d 的树突状细胞, 经多聚赖氨酸沉淀于盖玻片上, 用 3% 的戊二醛和 1% 冰醋酸固定, 经乙醇梯度脱水, 扫描电镜

下观察树突状细胞形态。

**1.2.3 细胞表型检测** 在  $2.0 \times 10^5/\text{mL}$  的树突状细胞悬液中, 分别加入 CD80、CD86、CD11c、HLA-DR 单抗, 2 h 后, 经 PBS 离心洗涤, 加入抗原, 45 min 后流式细胞检测。

**1.2.4 分别于树突状细胞培养** 第 6 天及第 7 天, 加入 FITC-OVA 抗原, 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续孵育 1 d, 准备 PE-CD11c 荧光素标记的单克隆抗体于 200  $\mu\text{L}$  的 PBS, 至期望浓度。单抗放置于冰上。低温保存, 共聚焦显微镜下观察树突状细胞吞噬抗原能力。

## 1.3 统计学处理

实验数据以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 数据处理应用 SPSS 软件包进行。流式细胞组间差异比较采用配对 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 倒置显微镜下观察树突状细胞的形态

从倒置显微镜下可以看出, 树突状细胞在培养第 2 天细胞呈均匀分布, 形态单一, 散在排列。晃动培养板可见随板晃动的细胞。在散在排列的细胞中, 可分辨出呈团簇状排列的细胞团块。细胞培养第 6 天, 加入 LPS 后, 可见细胞较大, 胞质丰富, 悬浮的细胞, 细胞膜表面分布许多分枝状突起, 见图 1。

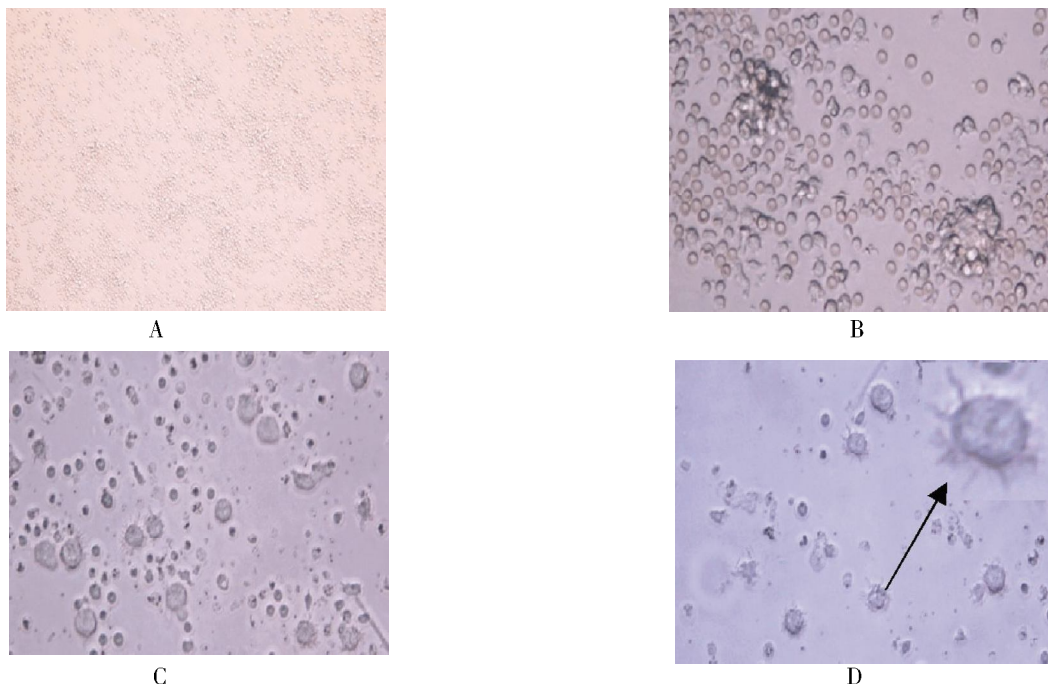


图 1 树突状细胞经分离、诱导、培养后不同时期树突状细胞的生长变化

Fig. 1 The different period of DCs after separation, induction and cultivation

A: 0 d (200 $\times$ ); B: 2 d (400 $\times$ ); C: 6 d (400 $\times$ ); D: 7 d (400 $\times$ ).

2.2 扫描电镜观察树突状细胞形态

电镜下观察树突状细胞，细胞表面粗糙，有层叠状褶皱，细胞膜上分布大量外生的突起，见图 2.

2.3 树突细胞表型变化

加入 LPS 前后，树突状细胞表型有明显改变. CD80、CD86、HLA-DR 在加入 LPS 前后，其细胞阳性表达率明显增加，差别都具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，说明加入 LPS 后，树突状细胞共刺激分子 CD80、CD86 及 MHC-II 类分子的表达增加. 而 CD11c 加入 LPS 前后，差别无统计学意义 ( $P > 0.05$ )，提示 LPS 对 CD11c 无明显影响，见图 3、图 4 及表 1.

2.4 共聚焦显微镜下观察树突状细胞吞噬抗原能力

图中细胞膜经 PE-CD11c 标记，共聚焦显微镜下呈红色荧光，抗原为 FITC-OVA 标记，共聚焦显微镜下呈绿色荧光，见图 5.

共聚焦显微镜下可看到经 PE-CD11c 标记的细胞膜，使细胞膜表面呈现红色荧光，并可辨别树突状细胞表面形态，树突状细胞表面不规则，有大量外生的树突状突起，细胞内可见 FITC-OVA 标记，呈现绿色荧光的抗原，在细胞内部均匀分布. 加入 LPS 后，随树突状细胞的成熟，树突表面突起明显增加，但细胞对抗原的摄取明显减弱.

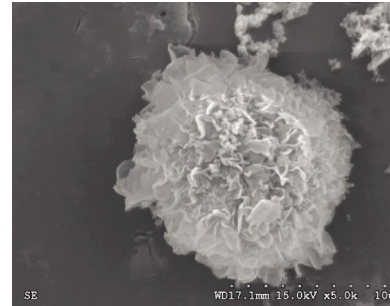


图 2 培养第 7 天树突状细胞 (5 000×)  
Fig. 2 The morphology of DCs on the 7th day after culture (5 000×)

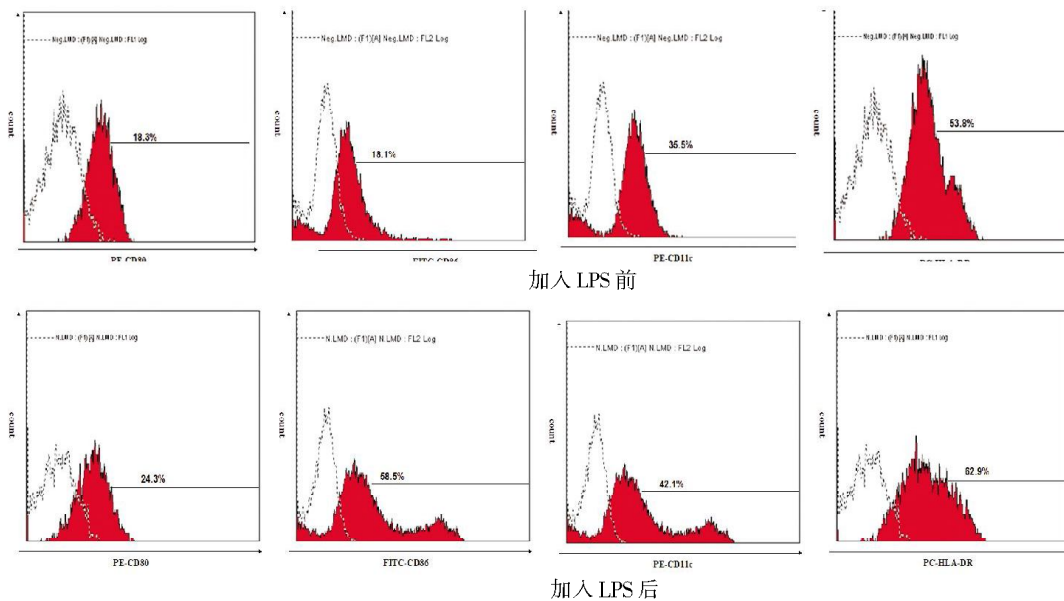


图 3 树突状细胞成熟前后细胞表型的变化

Fig. 3 Comparison of phenotype of DCs after and before maturation

表 1 树突状细胞成熟前后细胞表型阳性细胞数改变 [%,(x ± s)]

Tab. 1 Comparison of phenotype expression of DCs after and before maturation [%,(x ± s)]

树突状细胞	CD11c	CD80	CD86	HLA-DR
加入 LPS 前	37.0 ± 1.5	17.0 ± 1.1	17.2 ± 0.9	54.2 ± 0.4
加入 LPS 后	39.0 ± 2.5	24.9 ± 0.7*	59.3 ± 2.5*	65.9 ± 1.6*

与加入 LPS 前比较, \* $P < 0.05$ .

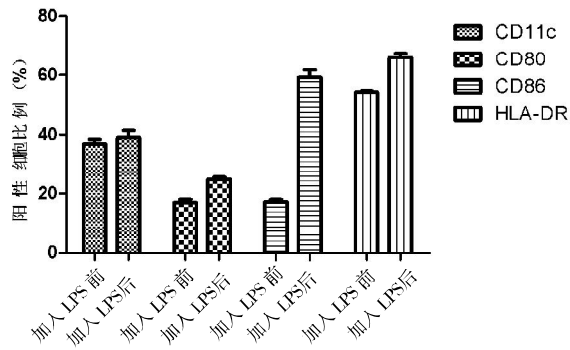


图4 树突状细胞成熟前后细胞表型的变化

Fig. 4 Comparison of phenotype of DCs after and before maturation

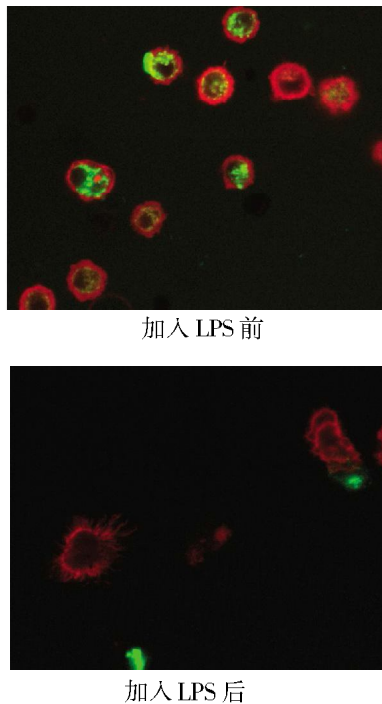


图5 示树突状细胞成熟前后抗原吞噬能力的比较 (×800)

Fig. 5 Comparison of antigen engulf function of DCs after and before maturation (×800)

图中细胞膜经 PE-CD11c 标记, 共聚焦显微镜下呈红色荧光, 抗原为 FITC-OVA 标记, 共聚焦显微镜下呈绿色荧光。

### 3 讨论

#### 3.1 从形态学上分析树突状细胞

1973年Steinman首次发现树突状细胞, 研究中发现树突状细胞在免疫应答机免疫耐受中占有重要地位, 树突状细胞 (dendritic cells, DC) 广泛分布于脑以外的全身组织及器官, 仅占人外周血单个核细胞的1%, 因其具有许多分枝状突起故名, 在倒置显微镜下<sup>[2]</sup>, 树突状细胞培养第1天, 在IL-4及GM-CSF诱导下, 细胞由散在、均匀排列的单

独细胞, 逐渐形成大量贴壁的细胞集落团块, 细胞大小从整体上观察均匀一致, 未见明显突起。而树突状细胞培养至第7天, 加入LPS后, 从培养液中可明显辨别出大量细胞质丰富, 在细胞培养液中呈悬浮状态的树突状细胞, 细胞膜表面呈现许多分枝状突起, 细胞集落团块减少或消失。电镜下, 观察树突状细胞, 细胞较大, 细胞表面粗糙, 有大量外生型突起。本实验采用Ficoll-Hypaque梯度离心法, 从外周血中分离出CD14<sup>+</sup>单个核细胞, 根据树突状细胞短暂性贴壁的特性, 分离出树突状细胞, 极大简化实验分离过程, 并且能够避免在间接贴壁中收集转移贴壁细胞对前体细胞的丢失, 此实验方法在大多实验中得到证实<sup>[3-4]</sup>。在CD14<sup>+</sup>细胞诱导成熟过程中, 加入GM-CSF、IL-4, 能使CD14<sup>+</sup>单个核细胞向未成熟的树突状细胞转化, GM-CSF是树突状细胞发育重要的细胞因子, 能诱导单个核细胞形成细胞集落, 并生产少量树突状细胞, IL-4的加入, 能抑制中性粒细胞及巨噬细胞的产生, 促进单核细胞向未成熟树突细胞转化<sup>[5]</sup>, 在试验中, 倒置显微镜下观察的大量集落刺激单位形成相一致。脂多糖是革兰氏阴性细菌细胞壁中的一种成分, 加入磷酸脂多糖 (LPS) 后, 未成熟细胞摄取LPS, 并与Toll样受体4结合, 增强IFN的表达, 从而导致未成熟树突细胞向成熟树突状细胞转化<sup>[6]</sup>。

#### 3.2 从表型上分析树突状细胞

未成熟树突状细胞表面表达低水平的共刺激分子及MHL-II类分子, 而高表达一系列受体, 如Toll样受体、C型凝集素等, 其形态与功能相适应, 高表达的受体有利于未成熟细胞识别、摄取抗原相关的物质。一旦未成熟树突状细胞受到炎症刺激, 未成熟细胞则会向成熟细胞转化, 其中共刺激分子及MHL-II表达水平显著提高, 其意义在提供T细胞活化的信号。如T细胞受体与MHC-抗原复合体结合传递信号, T细胞表型CD28与CD80/CD86结合传递信号, 从而启动获得性免疫应答<sup>[7]</sup>。实验中, 树突状细胞LPS刺激后, CD80、CD83、CD86、HLA-DR的表型显著较刺激前表达增高, 提示未成熟树突状细胞向成熟细胞转化, 这种现象与理论相适应。实验中发现, CD11c在LPS刺激前后, 都出现高表达现象, 提示CD11c可能是树突状细胞共有表型, 有待进一步研究证实。

#### 从抗原摄取能力分析树突状细胞

未成熟树突细胞具有较强的抗原吞噬能力, 抗原通过与树突状细胞Toll样受体结合, 并通过内 (下转第44页)

发症和医疗意外；与其他行业相比，医务人员面对的是身有疾病的患者，其工作关系到病人的生命的安全，行业的特殊性要求他们必须要有更强的责任心，其职业行为必须更加严格规范。医院的各项医疗规章制度是对医务人员的基本要求，若不严格执行将给患者带来极大的安全隐患，也使医院和医务人员在面对纠纷时处于十分被动的境地。

医疗纠纷虽然不可避免，但是通过医院管理者对其成因的分析，可以在一定的程度上防范医疗纠纷的发生。医院管理部门要不断修订和完善各类制度规范，还要加大宣传、教育和督导力度，提高医务人员的医疗水平和执行力，确保各项制度规范严格落实。只有这样才能有效的控制医疗纠纷的发

生，才能为患者就医提供更加舒适、更加轻松的医疗环境。

#### [参考文献]

- [1] 唐春爱. 22477例出院病人疾病构成帕累托图分析[J]. 中国医院统计,2008,15(4):346-347.
- [2] 李雅立. 出院患者22459例次疾病构成帕累托图分析[J]. 中国冶金工业医学杂志,2011,28(6):630-631.
- [3] 张涛. 医疗纠纷的成因探讨[J]. 国际护理学杂志,2007,23(5):534-536.
- [4] 宋会臻. 难以避免的医疗意外与对策探讨[J]. 中国误诊学杂志,2007,7(9):2028-2029.

(2015-01-03 收稿)

(上接第 37 页码)

吞、胞饮等作用，将抗原摄取进入细胞内，进而完成对抗原的加工处理过程。同时进一步诱导树突状细胞成熟，成熟的树突状细胞对抗原的摄取、加工能力较弱，但能发挥抗原递呈作用，将处理的抗原，递呈给 T 淋巴细胞，同时通过一系列共刺激分子、细胞因子等作用，诱导 T 淋巴细胞活化。模式抗原卵白蛋白 (OVA) 有良好的免疫原性，是常用的半抗原载体，用用荧光标记的 FITC-OVA 抗原，能较好的反应树突细胞摄取、加工抗原吞噬能力，在共聚焦显微镜下观察细胞内 OVA 分布、密度状况，可作为树突状细胞成熟能力鉴别方法之一。

目前对于人体树突状细胞研究已有大量报道，引起自身的特性，对树突状细胞的研究具有重要的临床意义。Giliet 等早期发现，在人体血液及组织中有两种特征性的树突状细胞组群：髓样树突状细胞 (conventional myeloid dendritic cells, mDC) 以及类浆细胞样树突状细胞 (plasmacytoid dendritic cells, pDC)，外周血中 pDC 的比例较 mDC 明显较高时，可诱导出现机体出现免疫耐受<sup>[9]</sup>。在未来的发展趋势中，树突状细胞将在肿瘤、移植免疫等方面研究中发挥重要的作用。

#### [参考文献]

- [1] WALLET M A, SEN P, TISCH R. Immunoregulation of dendritic cells[J]. Clin Med Res, 2005, 3(3):166-175.
- [2] BANCHEREAU J, STEINMAN R M. Dendritic cells and the control of immunity[J]. Nature, 1998, 392(19):245-255.
- [3] 高伟生, 罗荣成, 马树东, 等. 人外周血树突状细胞的分离与鉴定 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(11):2105-2109.
- [4] 陶晓根, 莫宝定, 陈剑, 张蕾, 等. 健康人外周血树突状细胞体外培养及表型鉴定 [J]. 临床和实验-医学杂志, 2012, 11(23):1837-1839.
- [5] BANCHEREAU. Immunobiology of dendritic cells [J]. Annu Rev Immunol, 2000, 18(4):767-811.
- [6] KAWAI T, AKIRA S. TLR signaling [J]. Cell Death Differ, 2006, 13(6):816-825.
- [7] REIS E SOUSA. Dendritic cells in a mature age [J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(6):476-483.
- [8] GILLET M, LIU Y J. Generation of human CD8T regulatory cells prime IL-10 producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand [J]. J Exp Med, 2007, 204(15):105-161.

(2015-01-13 收稿)